

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(45) 発行日 平成14年9月17日(2002.9.17)

(24) 登録日 平成14年7月5日(2002.7.5)

(51) Int.Cl.

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

C 1 2 N 15/09

G 0 1 N 33/50

P

G 0 1 N 33/50

33/566

33/566

C 1 2 N 15/00

A

請求項の数38(全 21 頁)

(21) 出願番号

特願平9-523864

(86) (22) 出願日

平成8年12月20日(1996.12.20)

(65) 公表番号

特表平10-503384

(43) 公表日

平成10年3月31日(1998.3.31)

(86) 国際出願番号

PCT/US 9 6 / 2 0 6 2 7

(87) 国際公開番号

WO 9 7 / 2 3 6 5 1

(87) 国際公開日

平成9年7月3日(1997.7.3)

審査請求日

平成9年9月24日(1997.9.24)

(31) 優先権主張番号

6 0 / 0 0 9 , 1 3 7

(32) 優先日

平成7年12月22日(1995.12.22)

(33) 優先権主張国

米国 (US)

(31) 優先権主張番号

0 8 / 7 0 0 , 5 8 3

(32) 優先日

平成8年8月14日(1996.8.14)

(33) 優先権主張国

米国 (US)

(73) 特許権者 999999999

エグザクト サイエンシース コーポレ  
イション

アメリカ合衆国 ニューハンプシャー

03110, ベッドフォード, オールド

エバーグリーン ロード 12

(72) 発明者

ラビダス, スタンリー エヌ,

アメリカ合衆国 ニューハンプシャー

03110, ベッドフォード, オールド

エバーグリーン ロード 12

(74) 代理人

999999999

弁理士 山本 秀策

審査官

橋岡 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ゲノム上不均一な細胞サンプルにおける形質転換細胞のクローン集団検出のための方法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】生物から得られる生物学的サンプルにおいて、形質転換細胞のクローン亜集団の存在を検出する方法であって、以下の工程：

a) 該生物学的サンプルから、形質転換細胞の該亜集団において変異していない該生物のゲノム領域に特有な第1の野生型ポリヌクレオチドの数値Xを決定する工程；

b) 該生物学的サンプルから、形質転換細胞の該亜集団において変異していることが推測される該生物のゲノム領域において、第2の野生型ポリヌクレオチドの数値Yを決定する工程；および

c) 数値Xと数値Yとの間に差異が存在するかどうかを決定する工程；

を包含し、ここで、統計学的有意差の存在は、該生物学

2

的サンプルにおいて、形質転換細胞のクローン亜集団を示唆する、方法。

【請求項2】前記形質転換細胞が悪性である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】前記生物学的サンプルが、胆汁、痰、精液、尿、血液、唾液、髄液、および生検組織からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】前記生物学的サンプルが糞便サンプルである、請求項1に記載の方法。

10 【請求項5】前記工程a)が、前記生物学的サンプルを、前記第1のポリヌクレオチドの少なくとも一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有する、第1のオリゴヌクレオチドプローブに曝す工程を包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項6】前記第1のオリゴヌクレオチドプローブが

検出可能に標識される、請求項5に記載の方法。

【請求項7】前記数値Xが、前記第1のポリヌクレオチドと二本鎖を形成する前記第1のオリゴヌクレオチドプロープの数に比例する、請求項5に記載の方法。

【請求項8】前記工程b)が、前記生物学的サンプルを、前記第2のポリヌクレオチドの少なくとも一部に相補的なヌクレオチド配列を有する、第2のオリゴヌクレオチドプロープに曝す工程を包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項9】前記数値Yが、前記第2のポリヌクレオチドと二本鎖を形成する前記第2のオリゴヌクレオチドプロープの数に比例する、請求項8に記載の方法。

【請求項10】前記第2のオリゴヌクレオチドプロープが検出可能に標識される、請求項8に記載の方法。

【請求項11】哺乳動物組織または体液サンプルにおいて、結腸直腸ガンまたは前ガン病巣の存在を検出する方法であって、以下の工程：

(a) 該サンプルを、複数の第1のオリゴヌクレオチドプロープおよび複数の第2のオリゴヌクレオチドプロープに、ハイブリダイゼーション条件下で曝す工程であって、それによって、

(1) 該第1のオリゴヌクレオチドプロープを、生物の野生型細胞に特有な第1のポリヌクレオチドセグメントのコピーとハイブリダイズさせ、そして

(2) 該第2のオリゴヌクレオチドプロープを、結腸直腸ガン細胞において、欠失または変異したことが推測される、野生型ゲノム領域に特有な第2のポリヌクレオチドセグメントのコピーとハイブリダイズさせる、工程；

(b) 該第1のプロープと該第1のセグメントとの間で形成された第1の二本鎖の数、および該第2のプロープと該第2のセグメントとの間で形成された第2の二本鎖の数を検出する工程；および

(c) 該第1のプロープと該第1のセグメントとの間で形成された二本鎖の数と、該第2のプロープと該第2のセグメントとの間で形成された二本鎖の数との間に差異があるかどうかを決定する工程；

を包含し、

ここで、統計学的有意差の存在は、該サンプルにおいて、直腸結腸ガンまたは前ガン病巣の存在を示唆する、方法。

【請求項12】前記第1および第2のオリゴヌクレオチドプロープのそれぞれが、個別に検出可能な標識に結合される、請求項11に記載の方法。

【請求項13】前記第1のオリゴヌクレオチドプロープが、1つの粒子に1つの第1のオリゴヌクレオチドプロープの割合で、第1の粒子に付着され、そして前記第2のオリゴヌクレオチドプロープが、1つの第2の粒子に1つの第2のオリゴヌクレオチドプロープの割合で、該第1の粒子とは区別して検出可能に第2の粒子に付着さ

れ、

ここで、前記検出する工程が、ハイブリダイズしていない第1および第2のオリゴヌクレオチドプロープから、ハイブリダイズした第1および第2のオリゴヌクレオチドプロープを分離し、その後、ハイブリダイズした第1および第2のオリゴヌクレオチドプロープを検出器に通過させて、前記第1および第2の数を決定する工程を包含する、

請求項11に記載の方法。

10 【請求項14】前記第1および第2の粒子が検出可能に異なるサイズの粒子である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】前記第1および第2の粒子が検出可能に異なる色の粒子である、請求項13に記載の方法。

【請求項16】前記工程a)の前に、前記サンプル中の二本鎖DNAを一本鎖DNAに変換し、そして前記第1および第2のポリヌクレオチドセグメントに対する相補物を取り出す工程をさらに包含する、請求項11に記載の方法。

20 【請求項17】前記取り出し工程が、前記相補物を、磁性粒子に付着される核酸プロープにハイブリダイズさせる工程、およびその後、前記サンプルから該磁性粒子を取り出す工程を包含する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】生物学的サンプルにおいて、細胞の亜集団中の標的対立遺伝子における核酸配列の変化を検出する方法であって、以下の工程：

(a)

(i) 該生物学的サンプル中の野生型標的対立遺伝子の量、および

(ii) 該生物学的サンプル中の対照対立遺伝子の量、を決定する工程；ならびに

30 (b) 該生物学的サンプルにおいて、細胞の亜集団中の標的対立遺伝子における核酸配列の変化を検出する工程；

を包含し、

ここで、該決定する工程で得られる野生型標的対立遺伝子の量および対照対立遺伝子の量における統計学的有意差が、核酸配列の変化を示唆する、方法。

【請求項19】前記決定する工程が、前記生物学的サンプルを、前記野生型対立遺伝子の一部とハイブリダイズし得る第1のオリゴヌクレオチドプロープ、および前記対照対立遺伝子の一部とハイブリダイズし得る第2のオリゴヌクレオチドプロープに曝す工程、および該生物学的サンプルから、いずれかのハイブリダイズしていない第1または第2のオリゴヌクレオチドプロープを除去する工程を包含する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】前記生物学的サンプルが、糞便、胆汁、精液、血液、組織、および尿からなる群より選択される、請求項18に記載の方法。

【請求項21】前記標的対立遺伝子が腫瘍抑制対立遺伝子である、請求項18に記載の方法。

50 【請求項22】前記腫瘍抑制対立遺伝子がp53対立遺伝

了である、請求項18に記載の方法。

【請求項23】細胞物質の不均一なサンプルにおいて、標的対立遺伝子の亜集団におけるヌクレオチド配列の変化を検出する方法であって、以下の工程：

a) 該不均一なサンプルを、ハイブリダイゼーション条件下で、複数の第1の単離アローブに曝す工程であって、ここで、該第1の単離アローブのそれぞれが、該標的対立遺伝子のコーディング鎖、および該標的対立遺伝子のコーディング鎖の相補物からなる第1の群より選択されるただ1つのメンバーの少なくとも一部にハイブリダイズし得る、工程；

b) 該不均一なサンプルを、ハイブリダイゼーション条件下で、複数の第2の単離アローブに曝す工程であって、ここで、該第2の単離アローブのそれぞれは、対照対立遺伝子のコーディング鎖、および該対照対立遺伝子のコーディング鎖の相補物からなる第2の群より選択されるただ1つのメンバーの少なくとも一部にハイブリダイズし得る、工程；

c) 該不均一なサンプルを、ハイブリダイゼーション条件下で、複数の第1のハイブリダイゼーションアローブに接触させる工程であって、ここで、該第1のハイブリダイゼーションアローブのそれぞれは、該第1の単離アローブがハイブリダイズしない該第1の群のメンバーの少なくとも一部にハイブリダイズし得る、工程；

d) 該不均一なサンプルを、ハイブリダイゼーション条件下で、複数の第2のハイブリダイゼーションアローブに接触させる工程であって、ここで、該第2のハイブリダイゼーションアローブのそれぞれは、該第2の単離アローブがハイブリダイズしない該第2の群のメンバーの少なくとも一部にハイブリダイズし得る、工程；

e) 該不均一なサンプルから、ハイブリダイズしていない第1および第2のハイブリダイゼーションアローブを除去する工程；

f) 該除去する工程の後、該不均一なサンプル中に残存する該第1および第2のハイブリダイゼーションアローブのそれぞれの量を決定する工程；および

g) 該標的対立遺伝子の亜集団における対立遺伝子の消失を、該決定する工程で得られる該第1のハイブリダイゼーションアローブおよび該第2のハイブリダイゼーションアローブの量における統計学的有意差として検出する工程；

を包含する、方法。

【請求項24】前記第1および第2のハイブリダイゼーションアローブが差次的に標識される、請求項23に記載の方法。

【請求項25】前記第1および第2のハイブリダイゼーションアローブが、それぞれ第1および第2のハイブリダイゼーションビーズに、1つのビーズに1つのアローブの割合で付着される、請求項23に記載の方法。

【請求項26】前記第1のハイブリダイゼーションビー

ズが、前記第2のハイブリダイゼーションビーズとは異なるサイズのビーズである、請求項25に記載の方法。

【請求項27】前記検出する工程が、前記第1および第2のハイブリダイゼーションビーズをコールターカウンタに通過させる工程を包含する、請求項26に記載の方法。

【請求項28】前記標的対立遺伝子が、その変異が疾患に関連している対立遺伝子である、請求項23に記載の方法。

10 【請求項29】前記疾患がガンである、請求項28に記載の方法。

【請求項30】前記細胞物質のサンプルが、患者から得られる糞便サンプルである、請求項28に記載の方法。

【請求項31】生物学的サンプルにおいて、細胞の亜集団中の多型性遺伝子座における欠失を検出する方法であって、以下の工程：

a) 該生物学的サンプルにおいて、多型性遺伝子座での母系対立遺伝子の量を検出する工程；

b) 該生物学的サンプルにおいて、多型性遺伝子座での父系対立遺伝子の量を検出する工程；および

20 c) 該多型性遺伝子座での母系対立遺伝子の量と父系対立遺伝子の量との間に統計学的有意差が存在するかどうかを決定する工程；

を包含し、

ここで、統計学的有意差の存在が、該生物学的サンプルにおいて、細胞の亜集団中の該多型性遺伝子座での欠失を示唆する、方法。

【請求項32】前記多型性遺伝子座が、単一塩基多型性であり、そして前記母系対立遺伝子と父系対立遺伝子との間でヘテロ接合性である、請求項31に記載の方法。

【請求項33】前記検出する工程が、

a) アローブを、前記単一塩基多型性のすぐ隣にある母系対立遺伝子および父系対立遺伝子の両方における前記多型性遺伝子座の一部にハイブリダイズさせる工程；

b) 前記サンプルを、検出可能に標識したジデオキシヌクレオチドの混合物に、該ジデオキシヌクレオチドの該単一塩基多型性への適切な結合を可能にする条件下で曝す工程；

c) 該サンプルを洗浄する工程；および

30 d) 該サンプルに対して残存する、それぞれの検出可能に標識されたジデオキシヌクレオチドの量を計測する工程；

を包含する、請求項32に記載の方法。

【請求項34】前記検出可能な標識が、ラジオアイソトープ、蛍光化合物、および粒子からなる群より選択される、請求項33に記載の方法。

【請求項35】前記生物学的サンプルが、胆汁、血液、尿、痰、精液、唾液、髄液、生検組織、および糞便からなる群より選択される、請求項31に記載の方法。

50 【請求項36】前記多型性遺伝子座がヌクレオチド配列

のデータベースから同定される、請求項31に記載の方法。

# 【発明の詳細な説明】

## 発明の分野

本発明は、細胞サンプルにおいて、遺伝子の変異（欠失を含む）の存在を検出することによる、疾患の診断に有用な方法に関する。この細胞サンプルは、主要量の診断上関連性のない（正常な）遺伝物質内に存在する少量の変異遺伝物質を含む。本発明の方法は、ガンに特有な遺伝子の変異の検出において特に有用である。

## 発明の背景

ガンは、ゲノムの不安定性を特徴とする疾患である。一般に、ゲノムの不安定性は、ゲノムのヌクレオチド配列内の広い種類の崩壊を規定する。このような崩壊は、ヘテロ接合性の消失（通常、染色体DNAの広範な消失を特徴とする）、マイクロサテライトの不安定性（通常、DNA修復機構の欠損を示す）、および変異（挿入、欠失、置換、重複、再編成、または修飾を含む）を包含する。多くのゲノム不安定性は、ガンに関連している。例えば、多くのガン遺伝子および腫瘍抑制遺伝子における変異は、腫瘍発生に関連している。Duffy, Clin. Chem., 41:1410-1413 (1993)。さらに、P53腫瘍抑制遺伝子座でのヘテロ接合性の消失は、種々のタイプのガンに相関している。Ridnappaら, Path. Res. Pract., 191:399-402 (1995)。apcおよびdcc腫瘍抑制遺伝子の消失または他の変異はまた、腫瘍発生に関連する。Blum, Europ. J. Cancer, 31A:1369-372 (1995)。最終的に、腫瘍発生もまた、マイクロサテライトの不安定性に相関する。

ゲノムの不安定性を特徴とする遺伝子の変化は、理論上、例えば、結腸ガンの早期のマーカーとなり得、そして生検を行った結腸上皮から、場合によっては、糞便物質に流出した形質転換細胞から単離したDNAにおいて検出され得る。Sidranskyら, Science, 256:102-105 (1992)。

当該分野において提唱されている検出方法は、時間を要し、かつ高価である。Duffy, 前掲。さらに、当該分野による方法は、細胞が不均一な（すなわちクローンが純粋でない）サンプル中に存在する場合、細胞の小さな亜集団におけるヘテロ接合性の消失またはマイクロサテライトの不安定性を同定するためには使用され得ない。例えば、米国特許第5,527,676号には、変異を検出しようとする組織サンプルは、p53遺伝子におけるヘテロ接合性の消失を検出するために、腫瘍細胞について富化されるべきであると記載されている。

PCRのような技術が、ヘテロ接合性の消失（後期の腫瘍に特有な広範な欠失から生じる）を検出するために使用されている。例えば、米国特許第5,330,892号を参照のこと。このような技術は、一般に、多数のプライマー対の使用を必要とし、そしてそれらは、不均一なサンプルにおいては全く作用しない。最近の刊行物は、早期の

腫瘍における変異の定量分析を実施するために、PCRおよびELISA技術を用いることを報告している。米国特許第5,512,441号。大部分が正常な細胞および細胞破片の不均一なサンプル中の細胞の異常な亜集団（亜集団はヘテロ接合性の消失またはマイクロサテライトの不安定性を特徴とする）の同定は、なおさらに困難である。なぜなら、このような検出は、ヌクレオチドフラグメントの亜集団の同定を包含し、このヌクレオチドフラグメントを、それらが存在する多量の不均一な正常細胞物質と区別するのは困難であるからである。さらなる問題は、増加する数の異なるガン遺伝子または腫瘍抑制遺伝子の任意の遺伝子座における変異がガンを生じ得るということであり、そしてこれらの遺伝子における全てまたはほとんどの遺伝子座を調べ得るスクリーニングアプローチは、現在利用可能ではない。

マイクロサテライトの不安定性はまた、ガンのマーカーであり得る。マイクロサテライトは、100,000塩基対において平均約1個の頻度で、ゲノム全体に散在する。これらは、安定な様式で正常に受け継がれる、タンDEMまたはトリヌクレオチド反復を含む。例えば、Charlesworthら, Nature, 371:215-220 (1994)を参照のこと。これらの配列は、ゲノム内で未知の機能を実施する一方、これらの多くはマップされ、そしてそれらの配列長多型（sequence length polymorphism）に基づくマーカーとして使用されている。ミスマッチ修復経路における欠損に関連するマイクロサテライトDNAのクローン変化は、遺伝性非ポリポーシス結腸直腸ガン（hereditary nonpolyposis colorectal cancer）（HNPCC）の適切なマーカーであると考えられる。HNPCC腫瘍サンプルにおいて、例えば、マイクロサテライトは、多数の挿入および/または欠失を有することが見出された。マイクロサテライトの不安定性は、ガン遺伝子または腫瘍抑制遺伝子におけるミスマッチ修復の不全に対する有効なマーカーであり得る。マイクロサテライトの不安定性自体は、ガンを示唆するものではないが、ガンの発症に重要な領域内で変異が起こり得ることの証拠である。当然、マイクロサテライトにおける不安定性の検出により、患者はガン細胞のクローン亜集団を発生する危険性があることが示されるということになる。

結腸直腸ガンは、西洋社会において、一般的な死亡原因である。結腸または直腸の長さに沿って生じるいずれの腫瘍または前ガン性ポリープは、細胞または細胞由来のDNAを結腸管腔内へ流出する。流出した細胞または細胞DNAは、糞便が結腸を通過する際に、通常糞便に取り込まれる。ガンの早期では、ガン細胞または前ガン細胞は、糞便中に流出した上皮細胞またはDNAの極めて小さな断片を提示する。結腸直腸ガンの現在の検出方法は、糞便中のガン細胞または前ガン細胞を検出することには注目していない。むしろ、そのような方法は、ガンの存在の細胞外の徴候（例えば、糞便中の潜血または血清中

に循環しているガン胎児性抗原の存在)に典型的に注目している。

しかし、散発性結腸直腸ガンと遺伝性結腸直腸ガンとの両方は、ガン遺伝子および腫瘍抑制遺伝子の変異から生じることが知られている。そのような変異は、疾患の病因に関する時点(これは、ガンの細胞外の微候または臨床的徴候が観察される時点よりもかなり早い)で生じると思われる。早期に検出されれば、結腸ガンは、ガン組織の外科的除去によって効果的に処置され得る。早期結腸ガンの外科的除去は、通常成功する。なぜなら、結腸ガンは結腸上皮の細胞内で始まり、そして上皮裏打ちを通る浸潤が生じるまで、全身性の循環から隔離されるからである。それゆえ、結腸直腸細胞における早期変異の検出は、生存率を著しく増大させる。

結腸ガン検出のための現在の非侵襲的方法は、糞便の潜血およびガン胎児性抗原の検出を包含する。これらのスクリーニング方法は、しばしば、直腸結腸ガンを検出しないか、または直腸結腸ガンが処置し得ない段階まで進行した後のみに結腸直腸ガンを検出するかのいずれかである。さらに、ガン胎児性抗原は、ガンの効果的な予測物ではなく、単に、再発性ガンの指示物であると考えられている。

内視鏡検査のような侵襲的技術は、効果的ではあるが、高価であり、そして苦痛を伴い、そして軽い患者のコンプライアンスを受ける。従って、現在の結腸ガンのスクリーニング方法は、大きなセグメントの集団をスクリーニングするのに実用的ではない。Blum, Europ. J. Cancer, 31A:1369-1372 (1995)を参照のこと。

従って、当該分野において、早期の結腸ガンを有する個体を同定するための信頼できる大規模スクリーニングの簡単かつ効率的な非侵襲的方法が必要とされている。そのような方法が、本明細書において提供される。

#### 発明の要旨

本発明は、ゲノム上形質転換された細胞または細胞破片の亜集団を検出するための方法を提供する。そのような方法は、細胞のクローン亜集団の生物学的サンプル中の存在を検出する。この細胞は、野生型のゲノム、ならびにサンプル中にも存在し得る細菌生物、寄生生物または混入生物とは異なるゲノムを有する。本発明の実施は、例えば、多量の「正常」DNAまたは全細胞を含む生物学的サンプルにおけるガンまたは前ガン細胞由来の微量のDNAの検出を可能にする。本方法の好適な使用は、患者が排泄した糞便のサンプルにおいて、微量の細胞および/または細胞破片の存在を信頼できる程度に検出することである。この微量の細胞および/または細胞破片は、無症候性前ガン病巣またはガン病巣の部位で結腸に流出されるDNAを含む。本発明は、例えば、既知のガン細胞タイプに特有な既知ゲノム部位でのDNA欠失を、信頼できる程度で検出し得るいくつかの重要な洞察を利用している。

一般に、本発明は、2つのゲノム配列の比較による測定を包含する。1つのゲノム配列は、形質転換の間安定である(すなわち、サンプル中の悪性細胞および野生型細胞の両方において同一である)。第2のゲノム配列は、典型的に形質転換の過程の間で変化を受ける(すなわち、悪性前駆細胞の発達の間に変異する)。各ゲノムの配列の存在を検出するために、ハイブリダイゼーションプローブを用いる。2つのゲノム配列を含むハイブリダイゼーション事象の数が異なる場合、この差異は、重要ではないバックグラウンドによるものであり得るか、またはサンプルを得た集団における2つのゲノム配列の量の統計学的有意差によるものであり得る。後者の場合、この差異は、規定された統計的信頼の程度で、改変された(すなわち、非野生型)ゲノム配列を有する細胞の亜集団のサンプルにおける存在と相関し得る。

本発明は、3つの一般的な実施態様に分けられ得る。

(1) 第1の一般的な実施態様において、サンプル中の目的の遺伝子または遺伝子フラグメント(すなわち、その変異がガンと関連していることが知られているか、または推測される遺伝子)の数量(コピー数)を、サンプル中の対照遺伝子または遺伝子フラグメントの数量と比較する。ここで、対照遺伝子は、通常ガンとは関連せず、そして通常低い変異率を有する遺伝子である。2つの数量間の統計学的有意差は、サンプル中の細胞亜集団におけるゲノムの不安定性を示唆する。(2) 本発明の第2の一般的な実施態様において、母系対立遺伝子(maternal allele)上の領域の数量を父系親対立遺伝子(paternal allele)上の対応する領域の数量と比較する。2つの数量間の統計学的有意差は、ゲノムの不安定を示唆する。(3) 第3の一般的な実施態様において、特定の遺伝子座におけるマイクロサテライト反復の数を、母系対立遺伝子と父系対立遺伝子との間で比較する。それらの数の統計学的有意差は、サンプル中の細胞の亜集団におけるミスマッチ修復機構のエラーを示唆するか、または対立遺伝子の消失が生じていることを示唆し得る。上記のように、ミスマッチ修復のエラーは、腫瘍抑制遺伝子またはガン遺伝子の変異を生じ得る。本発明の3つの実施態様のいずれかにおけるガンの検出は、少なくとも2つの異なるヌクレオチドプローブとそれらのそれぞれのゲノム配列との間のハイブリダイゼーションの数を測定することによって達成される。

本発明の1つの特徴は、今回、結腸を裏打ちする細胞(例えば、ポリープまたは病巣)由来の物質が、糞便の長さに沿った縦の筋(stripe)を含む領域でのみ、形成中の糞便に流出されることを見出したことにある。それゆえ、検査中の糞便サンプルが糞便全体であるか、または少なくとも糞便の断面を含まなければ、サンプルは偶然でしか、関連の診断情報を含まない。結腸は、その長さ全体を通して、多数の湾曲部およびひだを含む。米国

(添付の日付に提出)を参照のこと。結腸を裏打ちしている上皮細胞は、通常、結腸陰窩 (colonic crypt) の基底位置 (ここで、幹細胞が有糸分裂によって分裂する) から陰窩の頂点まで移動し、次いで管腔へ流出される。上皮を介する急速な代謝回転速度の結果として、腸管腔を裏打ちする結腸の上皮細胞は、典型的に4〜5日毎に再生を受ける。従って、糞便が管腔を通過すると、剥離した上皮細胞またはそれらのDNAは、形成中の糞便内に常に堆積される。糞便が直腸へ進み、そして (最初の流体状態から) 次第により固体になると、上皮細胞は、その上皮裏打ち内でそれらの細胞を以前に含んでいた管腔の部分と接触している糞便の部分へ剥離されるのみである。ポリープ (ポリープは前ガン性の増殖である; 全てのポリープがガン化するわけではないが、ほとんど全てのガンはポリープから生じる) の上皮細胞は、正常な結腸上皮細胞のために上記の同一の急速なライフサイクルおよび流出を受ける。従って、ポリープから流出される細胞は、典型的に、ポリープと接触する形成中の糞便の表面上に吸収されるのみである。しかし、糞便が流体状態である場合、糞便全体内に流出されるポリープ細胞の混合が自動的に起こる。

従って、本発明は、生物学的物質のサンプルにおける細胞の亜集団のゲノム変化を検出するための方法を提供する。本発明の方法は、診断上関連性のない生物学的物質の大きな不均一なサンプル中に存在する、細胞の小さな亜集団における対立遺伝子のヌクレオチド配列の変化を検出するのに有用である。本発明の方法は、遺伝子の異常 (例えば、ヘテロ接合性の消失、またはより一般的には、ガンのような疾患と相関し得る変異) の検出および診断に有用である。本発明の目的のため、文脈が他の意味を要しない限り、「変異」は、ゲノムDNAまたはその相当するmRNAの一部における修飾、再編成、欠失、置換、および付加を包含する。

好適な実施態様において、本発明は、ヒトのような生物から得られる生物学的サンプルに含まれる、または含まれることが推測される形質転換細胞のクローン亜集団を検出するための方法を提供する。本方法は、生物学的サンプルから、野生型細胞または形質転換細胞のいずれかにおいて変異していないことが知られているか、または変異していないと推測される第1の野生型ポリヌクレオチドの数値Xを決定する工程を包含する。さらなる工程は、生物学的サンプルから、生物学的サンプル中の細胞の亜集団において、変異していることが推測される第2の野生型ポリヌクレオチドの数値Yを決定する工程を包含する。次いで、XとYとの間に、統計学的有意差が存在するかどうかを決定する。正常なサンプルには、変異は存在しない。従って、正常細胞の体細胞遺伝子のそれぞれの数の間に統計学的有意差は存在しない。結果として、XおよびYは、統計学的に有意という意味で相互に差異はない。対照的に、XとYとの間に統計学的有意

差の存在は、変異を具体的に示す生物学的サンプルにおいて、形質転換細胞のクローン亜集団の存在を示唆する。統計学的有意性は、当該分野において公知の任意の方法によって決定され得る。しかし、統計学的有意性の正規の測定を、任意の所定のアッセイと共に実施する必要はない。むしろ、アッセイは、大きく十分な数の結合事象を検出するように設計され、それによって少なくとも数値間の閾値の差異 (threshold difference) は、任意の所望のレベルの確実性で、細胞の変異亜集団の存在の問題の方向性を決定する。

また、好ましい実施態様において、本発明に従う方法を用いて検出しようとする形質転換細胞は悪性細胞である。本発明の方法に従って検出される形質転換細胞は、誘導された形質転換体であり得、例えば、ウイルス、放射線、化学的手段、または他の発ガン性手段により形質転換され得る。本発明の方法は、組織および体液サンプルを含むいずれかの生物学的サンプルについて実施され得る。特に好ましい生物学的サンプルとしては、胆汁、痰、精液、血液、唾液、筋液、および尿が挙げられる。本発明の重要な実施態様において、サンプルは糞便であり、これは結腸直腸ガンまたは前ガンを検出するために分析される。本発明の方法は、第1のポリヌクレオチドの数値Xと、第2のポリヌクレオチドの数値Yとを別々に検出するために、生物学的サンプルを1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブに曝すことにより実施され得る。本発明において使用するためのプローブは、検出可能に標識される。好ましい標識は、例えば、アフィニティ結合対 (例えば、炭水化物/レクチンまたはアビジン/ビオチン) によって付着した蛍光標識を含む。極めて好ましい標識は、検出装置、好ましくは、本明細書に開示のような高速電子装置 (high speed electronic apparatus) によって計測される微細粒子である。数値Xおよび数値Yは、生物学的サンプルにおいて生じる標的ポリヌクレオチド検出事象の数に、好ましくは比例し、そして最も好ましくは等しい。

本発明の方法は、ヒトの結腸直腸ガンまたは前ガン細胞の検出に特に有用である。本発明の目的のために、前ガン細胞は、ガンに関連する変異を有し、そしてそのような細胞がガンになることを可能にする細胞である。このような方法は、糞便サンプル中の細胞またはヌクレオチド破片が、ヒトまたは他の哺乳動物の野生型ゲノムに正常に存在するポリヌクレオチドの欠失を含むかどうかを決定する工程を包含する。サンプルは、多数の第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイゼーション条件下で暴露され得、それによって (i) 第1のプローブを、サンプルの細胞において欠失していないことが知られているか、または推測される野生型ゲノム領域に特有な第1のポリヌクレオチドセグメントのコピーにハイブリダイズさせ、そして (ii) 第2のプローブを、サンプルにおいて変異していることが推測される



野生型ゲノム領域に特有な第2のポリヌクレオチドセグメントのコピーにハイブリダイズさせる。次いで、第1および第2のアローブのそれぞれとで形成される二本鎖の数を検出し、そして計測する。これらの2つの数における統計学的有意差の存在は、サンプルにおいて結腸直腸ガンの特徴であり得る変異の存在を示唆する。次いで、内視鏡検査または他の可視検査手順が指示される。

好ましい実施態様においては、アローブはビーズまたは粒子を用いて標識される。この実施態様において、サンプル中のゲノムポリヌクレオチドセグメントの検出に使用されるアローブは、好ましくはそのようなビーズに、1つのビーズに対して1つのアローブの割合で結合し、そして第1および第2のアローブに連結したビーズは、例えば、サイズによって区別され得る。このようなハイブリダイゼーションビーズまたは粒子を使用すると、例えば、「コールターカウンタ(coulter counter)」のようなインピーダンスカウンタを用いて、サンプル中のゲノムポリヌクレオチドセグメントの定量検出が容易になる。

本発明による方法はまた、少なくとも1つの単一塩基多形性を含む遺伝子座を含む母系対立遺伝子および父系対立遺伝子の量を決定することによって、対立遺伝子でのヘテロ接合性の消失を検出するのに用いられ得る。各対立遺伝子の量における統計学的有意差は、単一塩基多形性を含む対立遺伝子領域における変異を示唆する。この方法において、単一塩基多形性を含む対立遺伝子の領域は、例えば、GenBankのようなデータベースを用いて、または当該分野において公知の他の手段により同定される。アローブは、図3に示すような単一塩基多形性の直ぐ3'側の、父系および母系対立遺伝子の両方における相当領域にハイブリダイズするように設計される。ハイブリダイゼーション後、1つの共通ジデオキシヌクレオチドのうち少なくとも2つの混合物をサンプルに添加する。これらのジデオキシヌクレオチドは、それぞれ異なる検出可能な標識で標識される。DNAポリメラーゼもまた、添加される。多形性ヌクレオチドに隣接する対立遺伝子DNAを鋳型として用い、多形性ヌクレオチドに対する結合パートナーである単一のジデオキシヌクレオチドを添加することによって、ハイブリダイズしたアローブを伸長する。洗浄して取り込まれなかったジデオキシヌクレオチドを除去した後、アローブの伸長に取り込まれたジデオキシヌクレオチドを、例えば、フローサイトメーターまたはインピーダンスカウンタにおいて、それぞれ2つのジデオキシヌクレオチドを有する結合した伸長アローブの数を決定することによって、検出する。2つの異なる標識がほとんど等しい数だけ存在すれば、多形性ヌクレオチドで正常なヘテロ接合性が存在することを意味する。2つの標識の検出された数値間の統計学的有意差の存在は、多形性ヌクレオチドを含む領域の欠失が対立遺伝子の1つで生じたことを意味する。

本発明の方法は、患者が、追跡的侵入診断または他の手順(例えば、内視鏡検査)についての候補であるかどうかを決定するために使用され得る。例えば、本発明の方法は、患者から得られる糞便サンプルにおいて、細胞の亜集団中の腫瘍抑制遺伝子またはガン遺伝子における変異を検出するために使用され得る。次いで、変異を有すると診断された患者において、内視鏡検査手順が実施され得る。次いで、陽性の内視鏡検査結果に続いて、ポリプ切除術、外科手術、または他の処置を施して、ガン組織または前ガン組織を取り除く。

従って、本発明の目的は、細胞サンプルにおける細胞の亜集団のゲノム不安定性を検出するための方法を提供することである。本発明のさらなる目的は、細胞の亜集団における、ゲノムの変化を検出するための方法を提供することであって、ここで、ゲノムの変化はガンを示唆する。本発明の別の目的は、ガンに関連するゲノム領域(例えば、腫瘍抑制領域)におけるヘテロ接合性の消失を検出することである。本発明のなお別の目的は、単一塩基多形性核酸でのヘテロ接合性およびその消失を検出する方法を提供することである。最後に、本発明の目的は、糞便サンプルのような不均一なサンプルにおいてガンを示唆する細胞または細胞破片の検出によって、ガン、および特に結腸直腸ガンを検出するための方法を提供することである。

本発明のさらなる局面は、以下の詳細な説明および図面に関する考察に基づいて明らかになる。

#### 図面の説明

図1は、本発明の方法における一連の工程を示すフローチャートである。

図2は、本発明に従った、ハイブリダイゼーション半像を計測するのに有用なタイプのマルチオリフィスインピーダンスカウンタ(multi-orifice impedance counter)の概略図であって、ここで、参照番号1は、カラムの流量の方向を示し；参照番号2は、カラムにおいて物質を下方に送るためのプランジャー手段を示し；参照番号3および4は、異なるサイズのハイブリダイゼーションビーズであり；参照番号5は、所望しない粒子を抽出するための任意のフィルターであり；参照番号6は、微分インピーダンス(differential impedance)を測定するためのオリフィスの配列を示し；そして参照番号7は、回収チャンバーである。

図3は、単一塩基多形性を有することを特徴とする、対立遺伝子領域における4つの可能なアローブ付着部位を示す。図3において、配列M1は配列番号1であり；配列M2は配列番号2であり；配列M3は配列番号3であり；配列M4は配列番号4であり；配列F1は配列番号5であり；配列F2は配列番号6であり；配列F3は配列番号7であり；配列F4は配列番号8である。

図4Aおよび4Bは、モデルのガウス分布であり、統計的に確率の低い領域を示す。



図5は、細胞の不均一な集団についてのNの可能な値を示すグラフであり、ここで、1%の細胞が変異している。

#### 発明の詳細な説明

本発明による方法は、ゲノムの不安定性が、サンプルの細胞の小さな亜集団のみにおいて生じる、不均一な細胞サンプル中のゲノムの不安定性を検出するために有用である。従来の検出方法を用いる場合、ゲノムの不安定性の原因である変異が検出時に不明であるか、またはクローン的に不純な細胞集団が用いられている場合、そのような亜集団を特異的に検出するのは、不可能ではないにしても、困難である。例えば、米国特許第5,527,676号(p53遺伝子の欠失を検出するためには、細胞のクローン集団を用いるべきであると報告している)を参照のこと。発ガンに関与する変異を検出するための従来の方法は、細胞のクローン的に純粋な集団を用いることに依存し、そしてそのような方法は、k-rasのようなガン遺伝子における既知の「ホットスポット(hot spot)」で生じる変異を検出するに最も良好である。Sidransky, 前掲を参照のこと。当該分野のPCRに基づく方法を用いる場合、極めて多数のプライマーを設計しなければならず、そしてコロニー的に不純であり(すなわち、糞便のような不均一なサンプル)、かつ検出しようとする変異が未知で、極めて少数の細胞内に存在する細胞サンプルにおいて、ゲノムの不安定性を検出するためには、サンプルを多くの回数で試験しなければならない。さらに、ヘテロ接合性の消失を検出する現在の方法の場合、PCRは、遺伝子配列の欠如を検出するためには有用ではない。そのような反復試験の後でさえも、例えば、変異部位に接するプライマーを使用しなければ、PCRに基づく方法は、コロニー的に不純な集団において少数の細胞における変異を検出し得ない。それゆえ、初期の膀胱(変異細胞の集団が極めて小さい場合)において、当該分野の方法は、よくても実用的ではなく、そして全く作用し得ない。

対照的に、本発明の方法は、不純な細胞集団における少数の細胞中のゲノム不安定性を検出し得る。なぜなら、そのような方法は、どのような変異が存在するかを知ることに由来するのではなく、そしてそのような方法は、サンプル中の不均一なDNAの存在によって影響を受けないからである。例えば、ヘテロ接合性の消失では、ゲノムの多くの部分にわたって欠失が生じ、そして対立遺伝子全体を失い得る(または対立遺伝子を非機能性にするために、少なくとも対立遺伝子に十分な部分を失い得る)。本発明の方法は、変異していることが推測される遺伝子の数を計測し、そしてその数を、同じサンプルにおいて変異していないことが知られている遺伝子の数と比較する工程を包含する。変異が生じることが推測される野生型遺伝子の配列の少なくとも一部と、変異が生じなかったと推測される対照遺伝子の野生型配列の少な

くとも一部を知ることが必要とされるだけでよい。

従って、本発明の方法は、サンプル中の細胞またはそれ由来の破片の亜集団において存在するゲノムヌクレオチド配列の変化の検出に有用である。そのような変化は、一般に、細胞の亜集団において野生型対立遺伝子配列の変異(すなわち、置換、修飾、欠失、付加、または再編成)として生じる。腫瘍抑制遺伝子の場合、変異は、典型的にヘテロ接合性の消失に特有な広範な欠失の形態をとる。しばしば、ガンの特定の形態の場合、疾患を引き起こす変異は、最初、単一の細胞において生じ、次いでこれは変異細胞の小さな亜集団を産生する。変異の臨床症状が検出されるまで、疾患は治療不可能な段階にまで進行し得る。サンプルにおいて全細胞または細胞破片の小さいパーセントとしてのみ変異が存在する場合、本発明の方法は変異の検出を可能にする。

本発明の方法は、サンプル中に等しい数で正常(非変異)細胞中に存在することが予測される2つの野生型配列の比較を包含する。好ましい実施態様では、(1)サンプルの細胞において変異していないことが知られるまたは推測されるゲノムポリヌクレオチドセグメントの量(「対照」)と(2)サンプル中の細胞の亜集団において変異していることが推測される野生型(非変異の)ゲノムポリヌクレオチドセグメントの量(「標的」)との間の比較がある。2つのゲノムポリヌクレオチドセグメントの量の間の統計学的有意差は、変異が生じたことを示唆する。具体的には、腫瘍抑制遺伝子における消失の場合、対照遺伝子の検出量は、標的遺伝子の検出量より有意に大きい。標的配列が増幅される場合、特定のガン遺伝子の変異の場合のように、標的の検出量は、統計学的有意差で、対照遺伝子の検出量より大きい。

当該分野の方法は、欠失または点変異を検出するために、通常、PCRプライマーおよび/またはハイブリダイゼーションプローブの形態で、一般に、多くのプローブの使用を必要とする。しかし、本発明の方法は、ヌクレオチド配列の定量検出および安定であることが知られる配列と不安定であることが推測される配列との定量比較を包含し、ガンの危険性を正確に評価するために、2、3のプローブのみを使用しなければならない。事実、プローブの単一のセット(対)しか必要とされない。ガンの危険性が、発ガンと関与していることが知られる、またはそのように推測される遺伝子領域における変異の存在によって示唆される。本発明の方法により行われる試験に基づいて危険であることが同定されている患者は、次いで、疾患の確認および/または処置のための他の典型的な侵入手順に従う。

生物学的サンプルにおいて、均一に分布するヌクレオチド配列の定量的なサンプリングは、典型的にポアソン分布に従う。生物学的サンプルにおける典型的な数のゲノムポリヌクレオチドセグメントのような大きな集団に対して、ポアソン分布は、平均NおよびNの平方根とし

て近似され得る標準偏差で、正規の（ガウス）曲線に類似する。

生物学的サンプルから得られる標的遺伝子の数と対照遺伝子の数との間の統計学的有意性は、いずれかの適切な方法によって決定され得る。例えば、Steelら、Principles and Procedures of Statistics, A Biometrical Approach (McGraw-Hill, 1980) を参照のこと。本文の開示内容は、本明細書において参考として援用される。典型的な方法とは、所望のレベルの特異性（偽陽性の寛容性）および感受性（偽陰性の寛容性）に基づき、そして選択されたレベルの信頼度内で、選択されたレベルの統計学的有意性に達するために得られるべき標的遺伝子の数と対照遺伝子の数との間の差異を測定することである。そのような測定における閾値（threshold issue）は、（標的および対照のそれぞれについての）遺伝子の最小数  $N$  であり、これは統計的有意性の決定を可能にするために、集団において利用可能でなければならない。数値  $N$  は、変異対立遺伝子を含むサンプル中の変異対立遺伝子の最小数の仮定（本明細書では、少なくとも 1% と仮定される）および正常サンプルは変異対立遺伝子を含まないというさらなる仮定に依存する。また、対照遺伝子の数と標的遺伝子の数との間の閾値差は、サンプルにおける細胞の亜集団中に存在する変異が存在するという診断に対して、少なくとも 0.5% でなければならない。上記の仮定に基づき、0.5% 未満の変異対立遺伝子の数と対照遺伝子の数との間の検出される差異が、事実上、その時点で 99.9% の陰性結果である（すなわち、サンプルにおいて変異亜集団）ように、 $N$  がどの程度大きくなければならないかを決定することが可能である。

次いで、特異性についての  $N$  の計算は、一方のサンプル測定値が、集団の最小から 3.16%（図 4A における「A」を付した領域）を含むガウス分布の部分内にある確率、および他方のサンプルの測定値が、集団のうち最大から 3.16%（図 4B において「B」を付した領域）を含むガウス分布の部分内にある確率に基づいている。2つのサンプルの測定値は独立事象であるので、両事象が同時に起こる確率は約 0.001% または 0.1% である。それゆえ、ガウス分布のうち 93.68%（ $100\% - 2 \times 3.16\%$ ）は、図 5A の A および B を付した領域の間にある。統計表は、このような領域が 3.72 の標準偏差に等価であることを示唆する。従って、0.5% の  $N$  は、 $3.72\sigma$  に等しい。 $\sigma$ （標準偏差）は

$$\sqrt{N}$$

に等しいので、 $N$  を 553,536 として方程式を解き得る。このことは、対照および標的を表す 2 つの数値のうち低い方が少なくとも 553,536 である場合、そして患者が正常である場合、数値間の差異は、その時点において約 99.9% で、0.5% 未満であることを意味する。

99% の感受性について要求される最小の  $N$  を決定する

ために、同様の分析を実施する。この時、片側ガウス分布の表は、平均から 1.28 の標準偏差（ $\sigma$ ）がガウス分布の 90% を含むことを示す。さらに、数値（対照または標的）のうち 1 つが、図 5 の「A」を付した領域内、または図 5 の「B」を付した領域内のいずれかにある確率は、10%（1% の平方根）である。2 つの集団の平均が合計で 1% の差である場合、そして標的遺伝子の数と対照遺伝子の数との間に 0.5% の差異がなければならない場合、いずれかの平均から統計的有意性の閾値までの距離は、99% 感受性に関する 0.25% の  $N$ （図 5 を参照のこと）に等価である。図 5 に示すように、0.25% の  $N$  は、ガウス分布の片側の約 40% に相当する。片側統計表は、ガウス分布の 40% が 1.28 の標準偏差に相当することを示す。従って、 $1.28\sigma$  は、 $0.0025N$  に等しく、そして  $N$  は 62,144 に等しい。それゆえ、異常なサンプルについては、2 つの数値のうち低い方が少なくとも 62,144 である場合、差はこの時点において約 99% で 0.5% を超える。反対に、これらの条件下で、この時点の 1% のみで誤った陰性診断がなされる。

99.9% の特異性（偽陽性の回避）および 99% の感受性（偽陰性の回避）の両者を有するために、標的対立遺伝子および対照対立遺伝子の両方の少なくとも 553,536（および 550,000 より大きい）を有するサンプルを用いるべきである。得られる数値間の少なくとも 0.5% の差異は、感受性について 99.0% の信頼レベルで有意であり、そして数値間の 0.5% より小さい差異は、特異性について 99.9% の信頼レベルで有意である。上記のように、他の標準的な統計試験が、統計学的有意性を決定するために用いられ得、そして上記はそのような 1 つの試験を表す。

上記の説明に基づき、当業者は、本発明の方法が、いずれの生物学的サンプルにおいても、ポリヌクレオチドの亜集団における変異を検出するのに有用であることを理解する。例えば、本明細書において開示される方法は、ガンのような疾患に関連する対立遺伝子の消失（ヘテロ接合性の消失）を検出するのに使用され得る。さらに、本発明の方法は、酵素活性の完全または部分消失のような代謝エラーの原因である、消失または塩基置換変異を検出するために使用され得る。例示の目的のために、以下は、結腸ガンの検出における本発明に従う方法の使用の詳細を提供する。発明の方法は、腫瘍抑制遺伝子における、変異（および特に、ヘテロ接合性の消失に典型的な大きな欠失）の早期検出に特に有用である。従って、以下の様式で例示されるが、本発明はそれのように限定されず、そして当業者は、それらの考察に基づいてその幅広い範囲の応用を理解する。

本発明に従う方法は、好ましくは、3 つのタイプの検出レジメ（regimen）のうちの 1 つを包含する。第 1 の好適な検出レジメにおいて、変異していることが知られているか、または推測されるポリヌクレオチドの最

は、変異していないことが知られているか、またはそのように思われる対照ポリヌクレオチドの量と比較される。第2の好適な検出レジメにおいて、母系対立遺伝子上の多形性ヌクレオチドの量は、相当する父系対立遺伝子上の相当する多形性ヌクレオチドの量と比較される。最後に、第3のレジメは、正常対立遺伝子におけるマイクロサテライト反復領域と、変異していることが知られているか、または推測される対立遺伝子における相当するマイクロサテライト領域との比較を包含する。全ての3つの例示的検出手段は、測定されるそれぞれの核酸の量の間に、差異が存在するかどうかを決定する工程を包含する。統計的有意差の存在は、測定される核酸のうちの1つに、変異が生じたことを示唆する。それゆえ、以下に記載の方法は、一般に、本発明の全ての形態に適用可能であり、その改変を図1に示す。

#### 1. 糞便サンプルの調製

患者により排泄された糞便から調製されたサンプルは、少なくとも1つの排泄された糞便の断面を含むべきである。上記のように、糞便は、剥がれた細胞に関して均一でない。糞便は結腸を通過するので、それが接触する結腸上皮の領域から剥がれた細胞を吸収する。従って、ポリープから剥がれた細胞は、形成中の糞便の一表面のみに吸収される（糞便がまだ液体で、腸蠕動によって均質化されている盲腸付近を除く）。糞便の典型的なサンプル（すなわち、少なくとも1つの断面）の採取、およびその均質化は、結腸の全上皮表面から剥がれた細胞が、分析のために処理された糞便サンプル中に存在することを確実にする。糞便は容器に排泄され、それは試験施設に移されるのに十分に少ないことが望ましい。容器は、従来の様式で排泄される糞便を受け入れるように、従来の便器に備え付けられ得る。容器は、十分な大きさのメッシュまたはスクリーンを含み、尿がそのメッシュまたはスクリーンを通過し、便器に達し得る間に糞便が保持されるような配置を含み得る。さらに、その容器は、排泄された糞便を均質化する手段を含み得る。さらに、容器は、糞便サンプル中に存在する細菌を中和し、そしてDNAの分解を阻害するために、均質化緩衝液、あるいはアルコールまたは高塩濃度溶液のような1種以上の防腐剤を導入するための手段を含み得る。

便器に合うように適合されるか、または単に排泄される糞便を受け入れるために適合される容器は、好ましくは、排泄された糞便サンプルおよびそれに添加される任意の溶液を含み、そしてにおいの発散を防ぐのに十分な封入手段を有する。容器は、便器の上に直接に配置される支持フレームを有し得る。支持フレームは、サンプルを堆積させるための一段高い位置または、容器内に排泄された糞便を封入するための閉鎖位置（示されていない）に配置され得る連結カバーに付着される。さらに、支持フレームは、支持フレームの頂上表面から底表面を通る中央開放横断路（traversing）を有する。底表面

は、便器の頂上表面と直接通じる。支持フレームの底表面からの伸長および中央開放の全周開の取り囲みは、排泄された糞便の捕獲手段である。排泄された糞便を捕獲するための手段は、支持フレームに固定して付着され得るか、または、糞便の堆積の後に取り出すために、取り外し可能に付着され得る。

一旦得られると、糞便サンプルは、リン酸緩衝化生理食塩水またはカオトロピック塩溶液のような適切な緩衝液で均質化される。均質化手段および均質化の材料は、一般に当該分野で公知ある。例えば、米国特許第4,101,279号を参照のこと。従って、特定の均質化手段は、当業者によって選択され得る。糞便サンプルのような生物学的サンプルのさらなる処理および分析のための方法を下記に示す。

#### II. 結腸ガンまたは前ガンの検出方法

##### A. 対照的

例示のために、本発明の方法は、典型的な糞便サンプルから得られた細胞中の、p53腫瘍抑制遺伝子中の欠失またはその他の変異を検出するために使用される。p53中のヘテロ接合性の消失はしばしば結腸直腸ガンに関連するので、p53遺伝子は良好な選択物である。p53のDNAコーディング領域に対応するmRNA配列は、GenBank受託番号M92424として報告される。当業者は、本明細書中に記載される方法が、任意の遺伝子中の変異を検出するために使用され得、p53欠失の検出がこのような方法の例であることを理解する。排泄された糞便サンプルの少なくとも1つの断面が得られ、そしてすぐ上に記載されるように調製される。DNAまたはRNAは、必要に応じて、当該分野で公知の方法に従ってサンプルから単離され得る。本明細書中に参考として援用されている、Smith-Ravinら、Gut, 36:81-86 (1995)を参照のこと。しかし、本発明の方法は、未処理糞便について実施され得る。

核酸は、例えば、制限消化によって、小さなフラグメントに切り取られるか、または切断され得る。産生される核酸フラグメントの大きさは重要ではなく、下記の制限に従う。変異していることが推測される標的対立遺伝子（この例においてp53）および対照対立遺伝子が選択される。対照対立遺伝子は、結腸ガン細胞で変異していないことが知られているか、推測される任意の対立遺伝子であり得る。一本鎖核酸フラグメントは、周知の方法を用いて調製され得る。例えば、本明細書中に参考として援用されている、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989)を参照のこと。

コーディング鎖またはその相補物のいずれかの部分が、本発明による方法で検出され得る。例示のために、p53のコーディング鎖および対照対立遺伝子の検出が記載される。p53および対照対立遺伝子の両方に対する相補物は、アンチ相補オリゴヌクレオチドアプローブ（単離アプローブ）に対するハイブリダイゼーションおよびその

後それによって形成された二本鎖の除去によって取り出される。一本鎖オリゴヌクレオチド混合物からの相補鎖を除去する方法は、当該分野で公知であり、アフィニティークロマトグラフィーのような技術を含む。一本鎖DNAへの二本鎖DNAの転換に際して、サンプルは、サンプルから単離除去されるべき配列に相補的である結合単離プローブを含有する、アフィニティークラムに通される。従来のカラムクロマトグラフィーは、相補物の単離に適している。分析されるべきDNAがカラムを通過する間に、付着された相補的ヌクレオチドを有するセファロースまたは任意の他の適切な物質を用いてバックされたアフィニティークラムを使用してカラム内で相補的DNAを単離し得る。Sambrook (前出) を参照のこと。代替として、単離ビーズが、以下に詳細に記載されているように相補物を取り出すために使用され得る。

相補鎖の除去後に、p53対立遺伝子の少なくとも一部分にハイブリダイズする第1オリゴヌクレオチドプローブ、および対照対立遺伝子の少なくとも一部分にハイブリダイズする第2オリゴヌクレオチドプローブを得る。プローブを、フルオレセインのような検出標識、または検出粒子で標識する。プローブに対して異なる標識が好ましい。

次に、標識プローブは、ハイブリダイゼーション条件下で、サンプルに曝される。このような条件は当該分野で周知である。例えば、本明細書中に参考として援用される、Wallaceら、Nucleic Acids Res., 6:3543-3557

(1979) を参照のこと。異なって (すなわち、異なる放射性アイソトープ、蛍光手段、または異なる大きさのビーズによって; 以下を参照のこと) 標識されている第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブは、サンプルの単一のアリコートに適用される。ハイブリダイゼーション条件下でのプローブのサンプルへの曝露後に、サンプルを洗浄して、すべてのハイブリダイズしなかったプローブを除去する。その後、ハイブリダイズしたプローブを、p53ハイブリッドおよび対照対立遺伝子ハイブリッドについて、別々に検出する。標準が、バックグラウンドを確立するためおよび結果を平衡化するために使用され得る。さらに、異なる蛍光標識が使用される場合、プローブ数は、サンプル中の単一蛍光事象を検出し得るために十分に希釈されたサンプル中で、特異な蛍光事象を計測することによって測定され得る。得られた結果の精度を確認するために、2連のサンプルを分析し得る。

検出されるp53量と検出される対照対立遺伝子量との間に統計学的有意差が存在する場合、p53での変異が生じ、そして患者は、結腸ガンが発達中または発達した危険性があることが検出され得る。統計学的有意差は、任意の既知方法によって決定され得る。好ましい方法は、上記に概説されている。

p53変異の測定は、臨床医が、さらなる診断および必要に応じて患者の症状を処置するために、内視鏡検査法

のようなさらなる処置を推奨することを可能にする。以下の実施例は、ハイブリダイゼーション事象の直接定量を可能にする、本発明の方法を例示する。

## 1. 標的および対照ポリヌクレオチドの増大定量のための方法

ハイブリダイゼーションプローブと標的または対照との間の結合事象の増大定量は、ハイブリダイゼーションプローブをビーズのような粒子 (ハイブリダイゼーションビーズ) に結合することによって達成される。

10 サンプル中のポリヌクレオチド量の厳密な定量測定を行うために、ハイブリダイゼーションビーズは、それぞれのビーズが単一オリゴヌクレオチドプローブに付着されるように、ハイブリダイゼーションを実施する前に構築される。

### a. プローブ-ビーズ組合せの調製方法

単一プローブを、大過剰のハイブリダイゼーションビーズと所定の型のオリゴヌクレオチドプローブ (すなわち、第1または第2のオリゴヌクレオチドプローブ) とをインキュベートして、ビーズに付着させる。プローブのビーズへの結合は、親和性結合対を用いて達成される。例えば、ビーズは、アビジンまたはストレプトアビジンによって被覆され得、そしてプローブはプローブのビーズへの付着に影響するように、ビオチンで標識され得る。ビーズおよびプローブの混合物は、実質的に100%のプローブがビーズに結合されるように攪拌される。次に、その混合物は、アフィニティークラムまたはプローブに相補的であるオリゴヌクレオチドで被覆された膜のようなマトリックスに曝される。付着されたプローブを有するビーズのみがマトリックスに付着し、残りが洗浄除去される。次に、結合されたプローブを有するビーズは、プローブと相補物との間のハイブリダイゼーションを融解することによって、マトリックスから解離される。マトリックスへの複数の曝露およびカラムの前洗浄は、非特異的結合を減少させる。さらに、標的 (すなわち、付着されたプローブを有さない) ビーズは、マトリックスに曝され、プローブの非存在下でマトリックスへ付着されることが予測され得るビーズのバックグラウンド数を測定され得る。

上記のような、プローブに対して大過剰のビーズの使用によって、回収された大多数のビーズは、1つのみの付着されたプローブを有することが予測される。例えば、混合物が、1000ビーズに対して1プローブの比率を有する場合、100万個中約1つのビーズのみが2つの付着されたプローブを有し、100万個中1つ未満のビーズが2つ以上の付着されたプローブを有することが、予測される。従って、ハイブリダイゼーションビーズは、下記のような標的および対照ポリヌクレオチドの厳密な定量をなし得るプローブと、有効な1:1の比率で提供される。

50 下記の各アッセイについて、2つの別個のハイブリダ

イゼーションビーズが使用される。第1のハイブリダイゼーションビーズは、標的ポリヌクレオチド（例えば、p53対立遺伝子）の少なくとも一部分に相補的である単一の第1のオリゴヌクレオチドアプローブに付着される。第1のハイブリダイゼーションビーズと異なる大きさの第2のハイブリダイゼーションビーズは、対照ポリヌクレオチド（すなわち、サンプル中で変異されていないことが知られているか、または推測されるもの）の少なくとも一部分に相補的である単一の第2のオリゴヌクレオチドアプローブに付着される。

#### b. 標的および対照ポリヌクレオチドを定量するためのビーズの使用

DNAを、周知の方法によって融解する（変性して一本鎖DNAを形成する）。例えば、本明細書中に参考として援用される、Gyllensteinら、Recombinant DNA Methodology 11, 565-578 (Wu編、1995)を参照のこと。本発明の方法に従って、標的および/または対照ポリヌクレオチドを定量するために、コーディング鎖またはその相補物のいずれかが検出され得る。例示の目的のために、本発明の実施例は、コーディング鎖の検出を仮定する。

#### 2. 相補物の除去

標的ポリヌクレオチド（例えば、p53）および対照ポリヌクレオチドの一本鎖相補物は、標的または対照相補物に相補的であるオリゴヌクレオチドアプローブに対する結合によって、サンプルから除去される。このようなアプローブは、本明細書中では単離アプローブと呼ばれ、サンプルへのそれらの導入前に、単離ビーズに付着される。そのビーズは磁化され得る。従って、磁化された単離ビーズ（付着された単離アプローブを有する）がサンプルに導入されると、付着された単離アプローブは、標的または対照の相補物にハイブリダイズする（または逆に）。単離ビーズは、好ましくは、相補物結合を飽和するため、大過剰に導入される。一旦ハイブリダイゼーションが完了すると、サンプルに磁場が適用され、従って、サンプルから磁化された単離ビーズが引き付けられる（ハイブリダイズされた相補物の存在下、および非存在下の両方）。単離ビーズの十分な量がサンプルに導入されると仮定すれば、単離ビーズの除去は、サンプルから全標的および対照相補物を有効に除去する。相補物の除去に対する別の実施態様では、付着されたビオチンを有する過剰のオリゴヌクレオチドアプローブが、ハイブリダイゼーション条件下で、脱ハイブリダイズされたサンプルに曝される。一旦ハイブリダイゼーションが完了すると、サンプルはアビジンを詰めたカラムに曝される。ビオチン結合アプローブは、遊離であるか、または相補物にハイブリダイズされていても、カラム上でアビジンによって結合される。検出されるべき標的および対照コーディング鎖を含む、残りのDNAは、カラムを通過される。上記のハイブリダイゼーションビーズの記載とは逆に、相補物の除去用ビーズは、多数のオリゴヌクレオチドが単

のビーズに結合するように、構築され得る。

#### 3. 標的および対照の検出および定量

2組のハイブリダイゼーションビーズを、上記のように調製する。ハイブリダイゼーションビーズの第1組の各メンバー（これらの全ては互いに同じである）は、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的である単一のオリゴヌクレオチドアプローブに付着された。同じハイブリダイゼーションビーズの第2組の各メンバー（これらの全ては互いに同じであるが、第1組とは同じではない）は、対照ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的である単一のオリゴヌクレオチドアプローブに付着された。第2組のハイブリダイゼーションビーズのメンバーの大きさまたは色は、第1組のハイブリダイゼーションビーズのメンバーのものと異なる。第1および第2のハイブリダイゼーションビーズはまた、他の特性に基づいて区別され得る。例えば、ビーズは、異なる波長でのそれらの蛍光によって区別される蛍光マーカーを付着し得る。異なる電気化学電荷を有するビーズもまた使用され得る。ビーズを区別するために使用される厳密な様式は、付着される第1および第2のビーズ間の区別に基づいて、第1および第2アプローブ間での区別が可能な限り、本発明には必ずしも必須ではない。

付着されたアプローブを有する両方の組のハイブリダイゼーションビーズは、ハイブリダイゼーション条件下でサンプルに曝され、それによって付着されたアプローブを対照または標的にハイブリダイズし得る。一旦ハイブリダイゼーションが完了すると、ハイブリダイズしていないビーズ/アプローブの組み合わせを除去するために、サンプルが洗浄される。ハイブリダイズしていないビーズ/アプローブの組み合わせは、例えば、アプローブ配列に相補的なDNAを有するカラムにサンプルを通過させることによって除去される。従って、いずれのハイブリダイズしていないビーズ/アプローブの組み合わせもカラムに保持されるが、一方、二本鎖はカラムを通過する。後に、サンプルは、二本鎖を形成した第1および第2のハイブリダイゼーションアプローブを定量するために、ハイブリダイゼーションビーズを特異的に計測するための手段に曝される。得られた数は、集団中の対照および標的ポリヌクレオチドのコピー数の正確な評価を提供する。なぜなら、特異的計測手段は別個のビーズを計測するからである。1つのビーズは、同様に、測定される核酸の1コピーを示す1アプローブに等しい。

特異的計測手段の例は、コールターカウンター（Coulter Electronics, Inc. Miami, Florida）のような、インピーダンス測定装置である。サンプルは、電流の特異的インピーダンスを測定することによって、2つの型のハイブリダイゼーションビーズを特異的に検出する装置に通過させられる。あるいは、装置は、蛍光、色、または他の変化を測定し得る。アッセイの速度を増すために、マルチオリフィス装置が使用され得る。マルチオリフィ

スインピーダンスカウンターは、略図的に図2に示されている。マルチオリフィス配列は、生理食塩水のような電気伝導液で満たされているカラムの1つの末端に配置される。ハイブリダイズされた標的または対照セグメントのいずれかを有するハイブリダイゼーションビーズは、そのカラムの反対の末端に挿入される。各オリフィスは、一度に1つのハイブリダイゼーションビーズのみを収容するのに十分に大きく、信頼性のあるインピーダンス測定を可能にするのに十分に広い。電圧は、各オリフィスを横切って通過される。各ハイブリダイゼーションビーズ（非伝導性である）は、各オリフィスを通過するので、多量の生理食塩水を置換し、従って、ビーズの大きさに比例する短いインピーダンス変化を生じる。これは、同様にビーズの大きさに直接相関する、測定可能な電流の減少を生じる。2つの異なるインピーダンス事象のそれぞれの数を収集することによって、ハイブリダイゼーションビーズ数の正確な評価、およびそれによって集団中の各型のプローブの数が得られる。

第1および第2のハイブリダイゼーションビーズの定量測定に際して、データを、第1および第2のハイブリダイゼーションビーズ（付着されたハイブリダイズプローブを有する）量の間に、統計学的有意差が存在するかどうかを測定するために、上記のように分析する。標的の量の統計学的有意性の減少は、標的対立遺伝子での変異を示唆する。p53遺伝子が標的対立遺伝子である場合、このような変異は、ガンまたは前ガン状態を示唆する。治療医は、内視鏡検査法およびポリープ切除手順のような、さらなる処置を示唆するための基礎として、このような結果を使用し得る。

#### B. 単一塩基多形性における変異の検出

上記の基本的な方法はまた、ヘテロ接合性の消失、または母系対立遺伝子および父系対立遺伝子間の単一塩基多形性部位でのその他の変異を検出するために適用され得る。典型的に、このような検出は、より大きな欠失またはその他の変異の指標である。しかし、単一多形性ヌクレオチドでの変異は、2つの対立遺伝子の1つにおける遺伝子機能を阻害するのに必要である全てであり得る。ヘテロ接合性の消失に関連する欠失は、相補的再重複（reduplication）と呼ばれる最近発見された現象のため、検出が困難であり得る。相補的再重複において、特定の遺伝子座における2つの対立遺伝子のうちの1つの消失は、残存する対立遺伝子の「再重複」をもたらす。通常、再重複は、残存する対立遺伝子を含む染色体上で起こり、そして染色体上の残存する対立遺伝子の位置にきわめて近接した、残存する対立遺伝子の1つ以上のコピーの産生に関係する。1つ以上の単一塩基対立遺伝子多形性を示す遺伝子座の場合では（すなわち、その遺伝子座でのヘテロ接合性は、その遺伝子座の1つ以上の領域での1つ以上の単一塩基の差異によって決定される）、相補的再重複は、欠失された遺伝子に対応する、

二本鎖配列の残存する対立遺伝子を含む染色体上で挿入をもたらす。最もストリンジントなハイブリダイゼーション条件下でさえ、欠失された配列に対して指向されるプローブのいくつかは、単一塩基多形性遺伝子座の再重複配列に結合する。従って、このような環境では、多形性部位（すなわち、単一塩基多形性を包含する対立遺伝子領域）に結合するプローブ数の実際の差異は、他の対立遺伝子再重複領域から生じた増加によって不明瞭にされ得るので、欠失は検出され得ない。

10 相補的再重複および非特異プローブ結合に関連する問題は、一般的に本発明の方法によって解決される。このような方法は、生物学的サンプルに含有される細胞の亜集団中の特異的遺伝子座に存在する2つの対立遺伝子のうちの1つにおける、欠失の検出を可能にする。腫瘍抑制対立遺伝子を含む、多数の対立遺伝子は、一定の核酸領域に関して、単一多形性ヌクレオチドを含有する。個体は、通常、特定の多形ヌクレオチドに対して、通常はホモ接合性またはヘテロ接合性のいずれかであり得る。多数の単一塩基多形性ヌクレオチド部位が、ほとんどの対立遺伝子に存在するので、所定の個体が、単一塩基多形性部位の少なくとも1つでヘテロ接合性である確立は高い。単一塩基多形性部位での2つのヌクレオチドの1つ（ここで、個体はヘテロ接合性である）での統計学的有意な減少は、この部位を包含する対立遺伝子での欠失に対するマーカーとして使用される。

30 既知の単一塩基多形性を含有するゲノム領域は、GenBank, EMBLのようなヌクレオチドデータベースまたは任意の他の適切なデータベースを参考にして同定される。本発明の目的のために、単一多形性ヌクレオチドが、より大きな多形性部位の一部を形成する（すなわち、単一塩基多形性が、より大きなポリヌクレオチド多形性の末端ヌクレオチドであり得る）かどうかにかかわらず、単一塩基多形性は、対立遺伝子の非多形性領域に隣接する単一多形性ヌクレオチドであることが意図される。ガン検出について、考慮される領域は、腫瘍抑制遺伝子のような、ヘテロ接合性の消失が優勢な領域である。所定の個体は、任意の同定された単一塩基多形性領域における多形性ヌクレオチドに対して、ホモ接合性またはヘテロ接合性であり得る。従って、多数の単一塩基多形性領域が同定されれば、少なくとも1つのヘテロ接合性単一塩基多形性領域がサンプル中に見出される確立は増加する。

40 一旦単一塩基多形性部位が同定されると、それらの部位のいずれが正常（すなわち、非ガンまたは前ガン）細胞中でヘテロ接合性であるかを決定するために、サンプルが患者から得られる。次に、サンプルは上記のように調製される。サンプル中の二本鎖DNAは、一本鎖DNAに転換される。次に、両方の対立遺伝子のコーディング鎖またはアンチコーディング鎖のいずれかがサンプルから単離される。以下の考察から明白であるように、本明細書



に開示されている方法は、コーディング鎖またはアンチコーディング鎖がサンプル中に保持されるかどうかに関しては同じである。

単一塩基多形性の領域部分に相補的であるオリゴヌクレオチドプローブが構築され、この部分は、5'-3' (コーディング) 鎖または3'-5' (アンチコーディング) 鎖が鋳型として使用されるかどうかにかかわらず、多形性ヌクレオチドのすぐ3'側であるヌクレオチドで終わる。図3は、上記のような(図3の配列は仮想であり、そしていづれの実際の配列をも示すことを意図されない)、4つの可能な鋳型鎖の各々に対する多形性ヌクレオチドのすぐ3'側である、4つの可能なプローブを示す。どちらかの鎖が、ヘテロ接合性および/またはその消失を測定するためのプローブ結合の鋳型として使用され得るが、鋳型にハイブリダイズされるプローブの配列は、使用される鎖に依存して異なる。プローブは、標的に対するプローブの有効且つ特異的なハイブリダイゼーションを可能にする、任意の長さであり得る。図3は、示されている仮想配列へのハイブリダイゼーションに有用な4つのプローブを例示する。プローブ配列の長さは、分析される各ゲノム領域に達するように決定され得る。好ましい長さは、約10および約100ヌクレオチドの間である。プローブの大きさはまた、単一塩基多形性を取り囲む領域の大きさに依存する(すなわち、もしあれば、次の隣接多形性の5'または3'領域)。オリゴヌクレオチドプローブの構築およびハイブリダイゼーションに関する詳細な説明は、当該分野において公知である。

一旦構築されると、各多形性領域に対する独特のプローブは、母系対立遺伝子および父系対立遺伝子の両方のうち、多形性ヌクレオチドまで(しかし、多形性ヌクレオチドを含まない)の領域にハイブリダイズする。多形性ヌクレオチドは、ヘテロ接合体において、母系対立遺伝子と父系対立遺伝子において異なる。図3は、前述のハイブリダイゼーション手順を示す。図3は、多形性ヌクレオチドを取り囲む領域の小さな部分のみを示す。図3に示されている対立遺伝子は、多形性部位でヘテロ接合性である(図3に太字で示されている)。

プローブは、当該分野における標準的な方法によって、その特異鋳型DNA(上記を参照のこと)にハイブリダイズされる。サンプルは、必要に応じて洗浄され、ハイブリダイズしていないプローブを除去し得る。プローブが結合した各単一塩基多形性領域は、多形性ヌクレオチドでヘテロ接合性またはホモ接合性であるかを決定するために、Sanger, Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA), 74: 5463-5467 (1977) に報告されているようなジデオキシシチエインターミネーション法の改変が使用され、これは、本明細書に参考として援用される。その方法は、4つの共通2',3'-ジデオキシドヌクレオシド三リン酸(ddATP, ddCTP, ddGTP, およびddTTP)のうち少なくとも2つを使用することを包含する。異なる検出標識が、各ジデ

オキシヌクレオシド三リン酸(ddNTP)に、当該分野で公知の方法に従って付着される。特異的に標識されたddNTPは、Perkin Elmer Corporation (カタログ番号401456) から入手可能である。次に、少なくとも2つの標識ddNTPが、上記のように、母系対立遺伝子および父系対立遺伝子にハイブリダイズされるプローブを有する各サンプルに曝される。どの2つのddNTPが使用されるかの選択は、ヘテロ接合多形性部位のヌクレオチドに依存する。Sequenase™ (Perkin-Elmer) のようなDNAポリメラーゼもまた、サンプル混合物に添加される。対立遺伝子鎖をプライマーとして使用して、ポリメラーゼはプローブの3'末端に1つのddNTPを付加し、この取り込まれるddNTPは、単一塩基多形性部位に存在するヌクレオチドに相補的である。ddNTPは3'水酸基を有さないもので、ハイブリダイズされたプローブのさらなる伸長は生じない。完了後に、サンプルを洗浄して、過剰なddNTPを除去する。次に、各サンプルにおいて標識を計測する。サンプル中の2つの特異的に標識されたddNTPの存在は、多形性部位のヘテロ接合性を示唆する。3'修飾がさらなる3'ヌクレオチドの結合(すなわち、プローブ伸長)を妨げ、そしてプローブの3'末端への修飾ヌクレオチドの結合を阻害しない限り、任意の3'修飾ヌクレオシド三リン酸が上記の方法において使用され得る。

ヘテロ接合性またはホモ接合性を確立するために、サンプルに存在する各標識量を測定する必要はない。例えば、特異的に標識されたデオキシヌクレオシド三リン酸は、ヘテロ接合性またはホモ接合性の測定に使用され得る。2つの異なる標識ジデオキシヌクレオチドがプローブに取り込まれるという事実だけで、分析される単一塩基多形性部位がヘテロ接合性であることを意味する。しかし、患者が多形性である部位の決定は、ガンを示唆し得る多形性部位での変化を検出するための今後の試験に使用され得る、多形性のベースラインを確立するのに有用である。多形性の存在は、本明細書に教示されている方法、ゲル電気泳動、またはその他の標準的な方法によって決定され得る。

多形性部位にヘテロ接合性が存在する場合、2つの特異的に標識されたddNTPの各々の量を計測することは、サンプル中の亜集団細胞におけるヘテロ接合性の消失(すなわち、欠失)が存在するかどうかの決定を可能にする。単一塩基多形性部位でヘテロ接合性である細胞を含有する正常(すなわち、非ガン)サンプルにおいて、プローブに添加される2つのddNTPの各々の検出量は等しい(統計学的有意の選択された制限内)ことが予測される。しかし、欠失が、サンプル中の亜集団細胞における2つの対立遺伝子のうちの1つに生じた場合、取り込まれた(標識)ddNTPにより検出される2つの対立遺伝子の各々の量間で、統計学的有意差が存在する。このような差の検出は、サンプル内のゲノム不安定性を示唆する。このようなゲノム不安定性、サンプル中のガンまた



は前ガン細胞の可能性を示唆する。

ddNTPが付着した対立遺伝子を正確に計測する能力を改善するために、ddNTPは、上記のような異なる大きさのハイブリダイゼーション型ビーズで標識される。標識ddNTPを含有する結合プローブを有する対立遺伝子は、コールターカウンターのような計測装置を使用して、上記のように計測される。さらに上記のように、異なる蛍光標識またはその他の計測手段が、取り込まれたddNTPを別々に検出するために、使用され得る。

単一塩基多形性部位でのヘテロ接合性の検出、およびヘテロ接合性の消失の検出は、別々の工程において測定され得る。例えば、プローブは、上記のように多形性であることが測定されるヌクレオチドにすぐに隣接して（しかしヌクレオチドを含まないで）ハイブリダイズされ得る。次に、4つのddNTPがサンプルに添加され、洗浄され、そして各標識の存在または非存在が検出され得る。1つの標識のみの検出は、サンプルが得られる個体が多形性ヌクレオチドの部位でホモ接合性であることを示唆する。2つの標識の検出は、個体がヘテロ接合性であることを意味する。ヘテロ接合性の遺伝子座が認められる。上記のように、ヘテロ接合性のベースライン決定が、標準デオキシヌクレオチドを使用してなされ得る。一旦ベースラインが確立されると、すぐ上に記載されているように、その個体に対する今後の試験がヘテロ接合性の消失を検出するためにヘテロ接合性遺伝子座について実施される。ガンの検出については、ヘテロ接合性遺伝子座は、典型的に、p53、dmc、apc、およびその他を含む腫瘍抑制遺伝子である。本発明の方法を使用して、ヘテロ接合性腫瘍抑制遺伝子座の「フィンガープリント」が構築され得る。フィンガープリントからの今後の偏差（すなわち、欠失）は、ガンの発達について価値ある情報を提供する。

結腸ガンの検出において、前述の方法が好ましく使用される。典型的な糞便サンプルは、上記のように調製される。糞便サンプルの少なくとも1つの断面は緩衝液に入れられ、そして均質化される。二本鎖DNAは一本鎖DNAに変換され、検出されるべき鎖の相補物が、上記のいずれかの方法によってサンプルから取り出される。残りの一本鎖DNAが、腫瘍抑制対立遺伝子のようなガン関連対立遺伝子中の既知の単一塩基多形性に基づいて設計されたプローブの複数のコピーに曝され、プローブは、上記のような多形性ヌクレオチドにすぐ隣接する所望の数のヌクレオチドとハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションが完了した後、サンプルは洗浄され、そして特異的に標識されたddNTPおよびDNAポリメラーゼに曝される。次に、サンプルは洗浄され、取り込まれなかったddNTPを除去する。任意の標識ddNTPの存在が測定される。2つの標識が検出される場合、サンプルが得られる個体は、多形性ヌクレオチドでヘテロ接合性である。対立遺伝子のヘテロ接合性および多形性対立遺伝子にすぐ隣接

する部位に適合するプローブ配列は、ヘテロ接合性の消失についての今後の試験における参考として注目される。あるいは、一旦、患者が遺伝子座でヘテロ接合性であることが決定されると、アッセイはサンプル中の亜集団細胞におけるヘテロ接合性の現時点の消失を決定するために、上記の様式で直ちに実施され得る。

### C. マイクロサテライト不安定性の分析

マイクロサテライトは、ゲノム全体に見出されるジヌクレオチドまたはトリヌクレオチド反復である。マイクロサテライト反復の特定の配列は、しばしば特定のゲノム配列に関連し、そして正常な条件下で安定に受け継がれる。典型的にマイクロサテライトコピー数の伸張は、ミスマッチ修復における欠損に関連する。従って、マイクロサテライト領域での変化は、患者がガンに導き得る他のゲノム領域での変異の危険性があることを示す。

ガン関連遺伝子での変異の指標として、マイクロサテライト不安定性を検出するために、最初に、目的の遺伝子に関連するマイクロサテライト領域が同定されなければならない。このような領域は、典型的に、GenBank、EMBLおよびその他のようなデータベースにおいて同定される。例えば、一旦p53腫瘍抑制遺伝子に関連する野生型マイクロサテライト領域が同定されると、マイクロサテライト領域およびマイクロサテライト領域のすぐ上・領域およびすぐ下・領域に広がるオリゴヌクレオチドプローブが構築される。プローブの正確な長さは、実験者によって決定され得る。マイクロサテライトが例えばp53に関連する母系対立遺伝子および父系対立遺伝子の両方において、5'および3'の伸張を含むマイクロサテライト領域にハイブリダイズするプローブが構築される。

体組織または体液の適切なサンプルが、本明細書に記載のように得られ、そして処理される。二本鎖DNAは変性され、そして上記のような過剰の母系プローブおよび父系プローブは、ハイブリダイゼーション条件下でサンプル導入される。プローブは、上記のように検出可能に標識される。検出されるべき鎖の相補物は、必要に応じて、上記の方法により取り出され得る。次に、サンプルは、ハイブリダイズしていないプローブを除去するために洗浄され、そしてハイブリダイズされたプローブの量が、定量的に検出される。

定量検出は、本明細書に記載の任意の手段によって達成され得る。例えば、プローブは、母系対立遺伝子に結合するプローブが、1つの大きさのビーズに付着され、そして父系対立遺伝子に結合されるプローブが、第1の大きさのビーズと区別される第2の大きさのビーズに付着されるように、ハイブリダイズビーズに付着され得る。付着されたプローブを有するビーズは、上記のように計測され得る。

母系対立遺伝子に結合するプローブ量と、父系対立遺伝子に結合するプローブ量との間の統計学的有意差の検出は、マイクロサテライト不安定性を示唆する。以前に

記載されたように、マイクロサテライト不安定性は、マイクロサテライトが存在する遺伝子座の変異を示唆する。マイクロサテライト領域が、腫瘍抑制遺伝子またはガン遺伝子に関連する場合、生物学的サンプル中の亜集団細胞の対立遺伝子におけるマイクロサテライト不安定性の検出は、ガンの可能性を示唆するか、あるいはガンまたは前ガンはすでに進行し得たことを示唆する。次に、本明細書に記載のようなさらなる試験（侵入または非侵入手段によるいずれか）が実施され得る。

別の実施例において、マイクロサテライトの「フィンガープリント」が、患者から得られたサンプル中のガン原因遺伝子に関連する領域から得られる。フィンガープリントは、ガン原因遺伝子（単数または複数）に関連する野生型マイクロサテライトの配列を包含する。一旦得られると、フィンガープリントは保存され、そしてガンの発達に関連し得る、マイクロサテライト領域の変化（すなわち、マイクロサテライト不安定性）をモニターするために、同じ患者由来のサンプルの今後の試験に使用される。マイクロサテライトの長さおよび/または配列の経時的な変化は、その病因学における早期のガン組織を検出および除去するための、さらなる試験および/または処置を処方するために使用され得る。

本発明は、その好ましい実施態様によって記載されている。本発明による多数のさらなる局面および利点は、前述の考察に基づき当業者には明白である。

#### 配列表

##### (1) 一般的情報:

###### (i) 出願人:

(A) 名称: イグザクトラボラトリーズ、インコーポレイテッド

(B) 番地: オールドエバグリーンロード12

(C) 市: ベッドフォード

(D) 州: ニューハンプシャー

(E) 国: アメリカ合衆国

(F) 郵便番号: 03110

(G) 電話:

(H) テレファックス:

(I) テレックス:

(ii) 発明の名称: ゲノム上不均一な細胞サンプルに\*

GGCATCGCA

##### (2) 配列番号2の情報:

###### (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 19塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

ATCGGCTTAC TGCGATGCC

##### (2) 配列番号3の情報:

###### (i) 配列の特徴:

#### \* おける形質転換細胞のクローン集団検出のための方法

(iii) 配列数: 8

(iv) 連絡住所:

(A) 名称: パテントアドミニストレイター、テスト、ワーウィッツアンドチボルト、エルエルビー

(B) 番地: ハイストリート125

(C) 市: ボストン

(D) 州: マサチューセッツ

(E) 国: アメリカ合衆国

(F) 郵便番号: 02110

(v) コンピューター読み出し形態:

(A) 媒体型: フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC互換用

(C) OS: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: パテントインリリース#1.0, バージョン#1.30

(vi) 現在の出願データ:

(A) 出願番号:

(B) 出願日:

(C) 分類:

(viii) 代理人/事務所情報:

(A) 氏名: メイヤーズ、トーマスシー

(B) 登録番号: 36,989

(C) 照会/記録番号: EXT-001PC

(ix) 電話回線情報:

(A) 電話: (617) 248-7000

(B) テレファックス: (617) 248-7100

##### (2) 配列番号1の情報:

###### (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 9塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: misc\_feature

(B) 存在位置: 1..9

(D) 他の情報:/注=「M1」

(xi) 配列: 配列番号1:

9

##### ※ (ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: misc\_feature

(B) 存在位置: 1..19

(D) 他の情報:/注=「M2」

(xi) 配列: 配列番号2:

※

19

★ (A) 長さ: 19塩基対

★ 50 (B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:misc\_feature  
GGCATCGCAG TAAGCCGAT

(2) 配列番号4の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 9塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

ATCGGCTTA

(2) 配列番号5の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 9塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

GGCATCGCA

(2) 配列番号6の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 19塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

ATCGGCTTAT TCGGATGCC

(2) 配列番号7の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 19塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

GGCATCGCAA TAAGCCGAT

(2) 配列番号8の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 9塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

ATCGGCTTA

\* (B) 存在位置: 1..9

(D) 他の情報:/注=「M3」

(xi) 配列: 配列番号3:

\*

19

※ (ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:misc\_feature

(B) 存在位置: 1..9

(D) 他の情報:/注=「M4」

10 (xi) 配列: 配列番号4:

※

9

★ (ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:misc\_feature

(B) 存在位置: 1..9

(D) 他の情報:/注=「F1」

(xi) 配列: 配列番号5:

★

9

☆ (ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:misc\_feature

(B) 存在位置: 1..19

(D) 他の情報:/注=「F2」

(xi) 配列: 配列番号6:

☆

19

◆ (ix) 配列の特徴:

30 (A) 特徴を表す記号:misc\_feature

(B) 存在位置: 1..19

(D) 他の情報:/注=「F3」

(xi) 配列: 配列番号7:

◆

19

\* (ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:misc\_feature

(B) 存在位置: 1..9

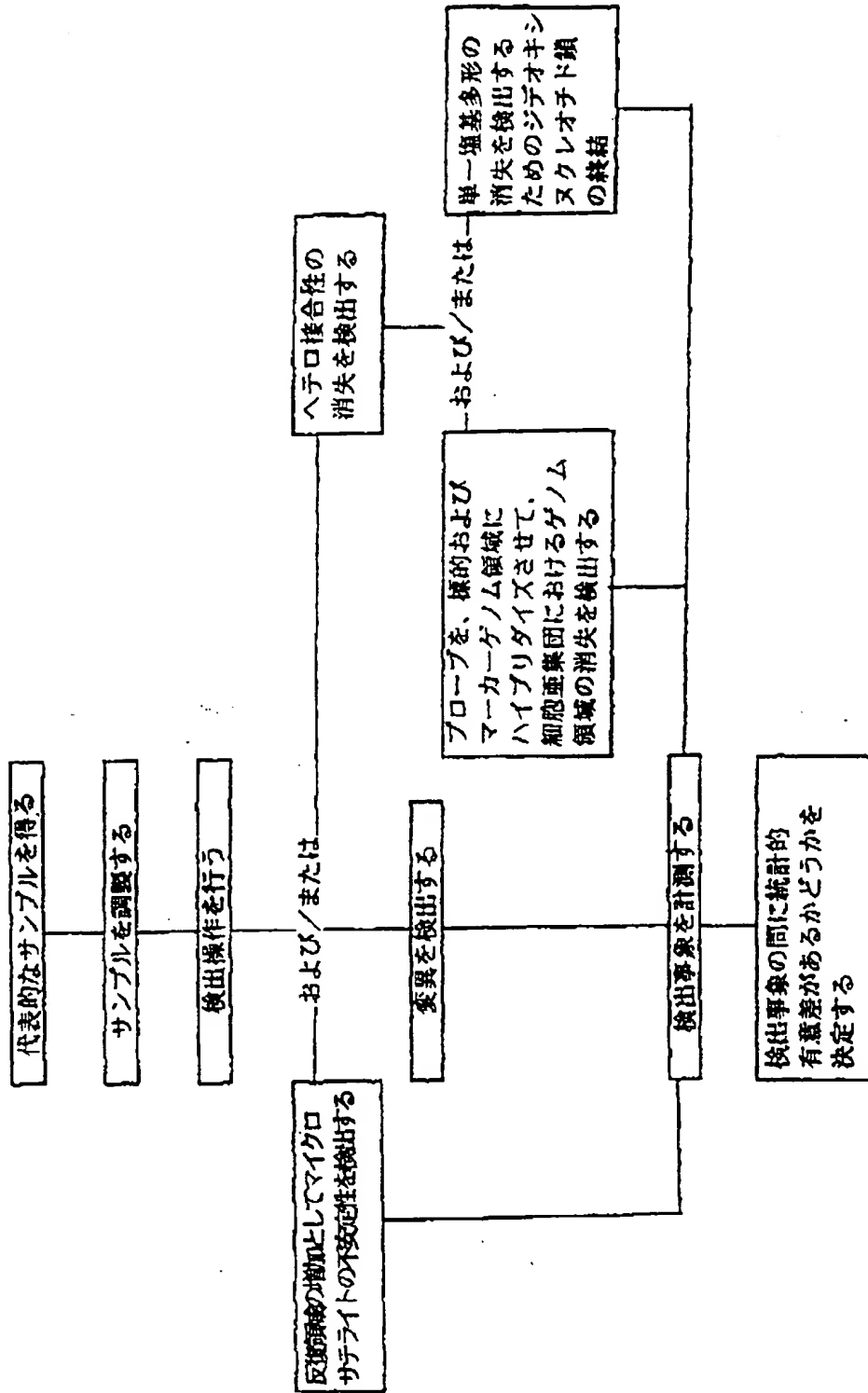
(D) 他の情報:/注=「F4」

40 (xi) 配列: 配列番号8:

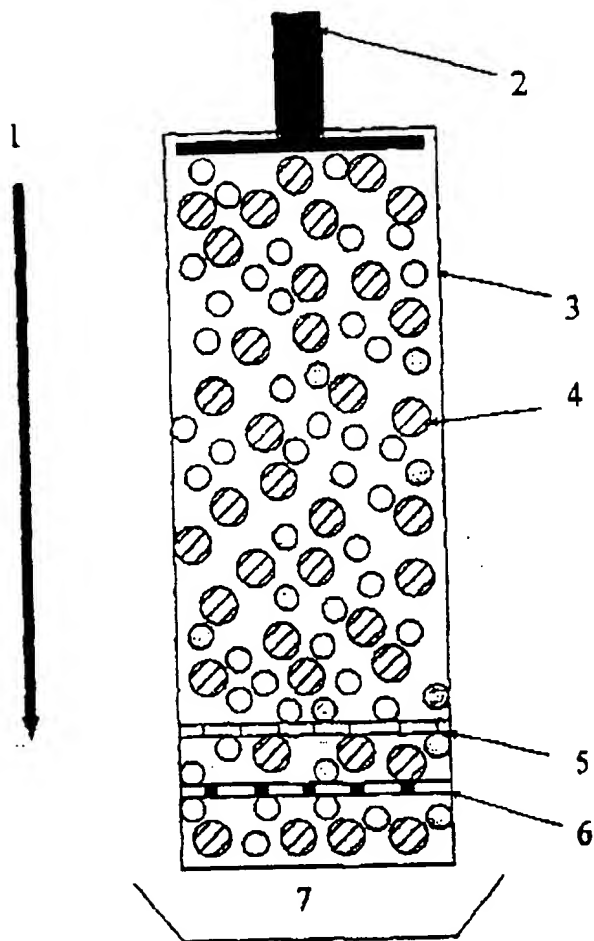
\*

9

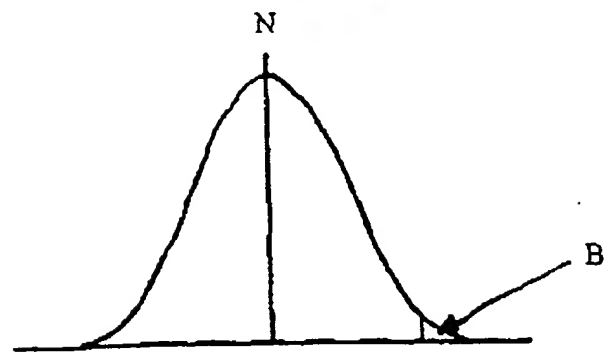
【第1図】



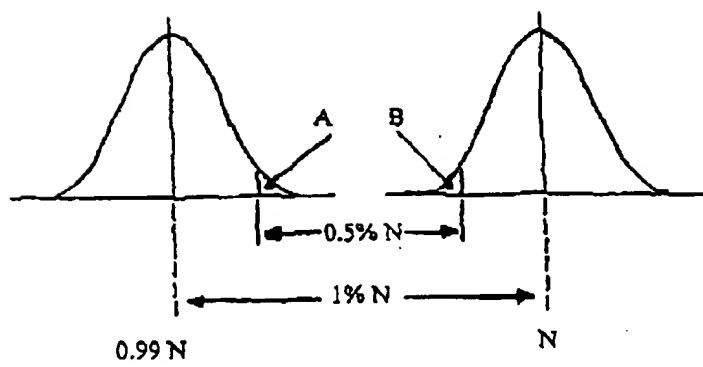
【第2図】



【第4B図】



【第5図】



## 【第3図】

1: 3'ACGCTACGG5'  
 2: 5'....ATCGGCTTA**C**TGCGATGCC....3'

M

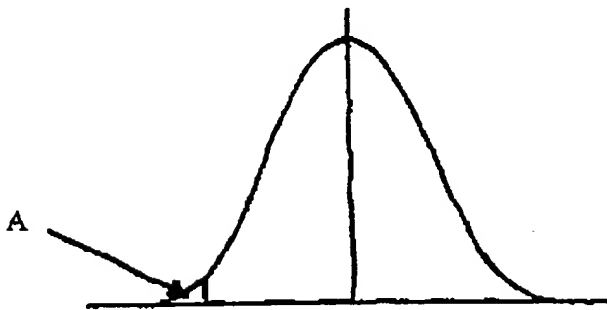
3: 3'....TAGCCGAAT**G**ACGCATCGG....5'  
 4: 5'ATCGGCTTA3'

1: 3'ACGCTACGG5'  
 2: 5'....ATCGGCTTA**T**TGCGATGCC....3'

F

3: 3'....TAGCCGAATA**A**ACGCTCGG....5'  
 4: 5'ATCGGCTTA3'

【第4A図】



フロントページの続き

(72)発明者 シュバー, アンソニー ビー.  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
 01757, ミルフォード, グラント ス  
 トリート 11

(72)発明者 アルマー, ケビン エム.  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
 02025, コハセット, マージン スト  
 リート 30

- (56)参考文献 特開 平3-4792 (JP, A)  
特開 昭59-199000 (JP, A)  
国際公開93/18186 (WO, A1)  
Nucleic Acids Research, Vol. 22, No. 20  
(1994), p. 41  
Clinica Chimica Acta, Vol. 226 (1994), p. 225  
-236

- (58)調査した分野(Int.Cl.7, DB名)  
C12N 15/09  
C12Q 1/68  
BIOSIS (DIALOG)  
WPI (DIALOG)  
MEDLINE



1/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2002 Thomson Derwent. All rts. reserv.

011373179

WPI Acc No: 1997-351086/199732

Related WPI Acc No: 1999-371142; 1999-429493; 2000-116776; 2000-146879;  
2000-647243; 2001-023574; 2001-638146; 2002-178975

XRAM Acc No: C97-113487

Detecting clonal sub-populations of malignant cells in a sample -  
especially useful for detecting colorectal cancer or cancerous lesions

Patent Assignee: EXACT LAB INC (EXAC-N)

Inventor: LAPIDUS S N; SHUBER A P; ULMER K M

Number of Countries: 022 Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No Kind Date Applicat No Kind Date Week

WO 9723651 A1 19970703 WO 96US20627 A 19961220 199732 B

US 5670325 A 19970923 US 96700583 A 19960814 199744

AU 9714307 A 19970717 AU 9714307 A 19961220 199745

EP 815263 A1 19980107 EP 96944531 A 19961220 199806

WO 96US20627 A 19961220

JP 10503384 W 19980331 WO 96US20627 A 19961220 199823

JP 97523864 A 19961220

CA 2211702 C 19990525 CA 2211702 A 19961220 199939

WO 96US20627 A 19961220

AU 711754 B 19991021 AU 9714307 A 19961220 200002

JP 3325270 B2 20020917 WO 96US20627 A 19961220 200268

JP 97523864 A 19961220

Priority Applications (No Type Date): US 96700583 A 19960814; US 959137 P  
19951222

Cited Patents: 4.Jnl.Ref; EP 664339; US 5302509; WO 9318186; WO 9409161; WO  
9411383; WO 9509929

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 9723651 A1 E 50 C12Q-001/68

Designated States (National): AU CA JP

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC

NL PT SE

US 5670325 A 21 C12Q-001/68

AU 9714307 A C12Q-001/68 Based on patent WO 9723651

EP 815263 A1 E C12Q-001/68 Based on patent WO 9723651

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU

MC NL PT SE

JP 10503384 W 52 C12Q-001/68 Based on patent WO 9723651

CA 2211702 C E C12Q-001/68 Based on patent WO 9723651

AU 711754 B C12Q-001/68 Previous Publ. patent AU 9714307

Based on patent WO 9723651

JP 3325270 B2 21 C12Q-001/68 Previous Publ. patent JP 10503384

Based on patent WO 9723651

Abstract (Basic): WO 9723651 A

A novel method for detecting the presence of a clonal subpopulation  
of transformed cells in a sample from an organism, comprises: (a)  
determining a number X of a first wild-type polynucleotide  
characteristic of a genomic region of the organisms that is not mutated  
in the subpopulation of transformed cells; (b) determining a number Y  
of a second wild-type polynucleotide suspected of being mutated in the  
cells; (c) determining whether a difference exists between X and Y,

where a statistically significant difference is indicative of a clonal subpopulation of the transformed cells.

USE - The method is used to detect a nucleic acid change in a target allele, e.g. a deletion at a polymorphic site, in a subpopulation of cells, especially in heterogeneous sample of cells.

The method is especially used to detect colorectal cancer or a pre-cancerous lesion in a mammalian tissue or body fluid (claimed).

ADVANTAGE - The method is able to detect genomic instability in a small number of cells in an impure cellular population, especially in the presence of heterogeneous DNA in the sample, without prior knowledge of the nature of the mutation.

Dwg.0/5

Abstract (Equivalent): US 5670325 A

A novel method for detecting the presence of a clonal subpopulation of transformed cells in a biological sample obtained from an organism, comprises:

- a) determining from the biological sample a number X of a first wild-type polynucleotide characteristic of a genomic region of the organism that is not mutated in the subpopulation of transformed cells;
- b) determining from the biological sample a number Y of a second wild-type polynucleotide in a genomic region of the organism suspected of being mutated in the subpopulation of transformed cells; and
- c) determining whether a difference exists between number X and number Y,

the presence of a statistically-significant difference being indicative of a clonal subpopulation of transformed cells in the biological sample.

Dwg.0/5

Title Terms: DETECT; CLONE; SUB; POPULATION; MALIGNANT; CELL; SAMPLE; USEFUL; DETECT; COLORECTAL; CANCER; CANCER; LESION

Derwent Class: B04; D16; P31

International Patent Class (Main): C12Q-001/68

International Patent Class (Additional): A61B-001/31; C12N-015/09;

G01N-033/50; G01N-033/566

File Segment: CPI; EngPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-E01; B04-F02; B11-C08E5; B12-K04F; D05-H09

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M750 M903 N102 N136 Q233 V754

\*02\* M423 M781 M903 N102 P831 Q233 V753

Chemical Fragment Codes (M6):

\*03\* M903 P831 Q233 R515 R521 R537 R614 R627 R639